

(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11)

EP 0 783 522 B1

(12)

EUROPÄISCHE PATENTSCHRIFT

(45) Veröffentlichungstag und Bekanntmachung des
Hinweises auf die Patenterteilung:
05.12.2001 Patentblatt 2001/49

(51) Int Cl.7: **C07K 14/635**, C07K 16/24,
G01N 33/78

(21) Anmeldenummer: **95934629.7**

(86) Internationale Anmeldenummer:
PCT/EP95/03757

(22) Anmeldetag: **22.09.1995**

(87) Internationale Veröffentlichungsnummer:
WO 96/10041 (04.04.1996 Gazette 1996/15)

(54) **PEPTIDE AUS DER SEQUENZ DES hPTH (1-37)**

PEPTIDES FROM THE hPTH SEQUENCE (1-37)

PEPTIDES DE LA SEQUENCE DE hPTH (1-37)

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT CH DE FR GB LI

(30) Priorität: **28.09.1994 DE 4434551**

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
16.07.1997 Patentblatt 1997/29

(73) Patentinhaber: **Pharlis Biotec GmbH**
30625 Hannover (DE)

(72) Erfinder:
• **FORSSMANN, Wolf-Georg**
D-30625 (DE)
• **ADERMANN, Knut**
D-30177 Hannover (DE)
• **HOCK, Dieter**
D-74924 Neckarsblschofsheim (DE)
• **MÄGERLEIN, Markus**
D-63785 Obernburg (DE)

(74) Vertreter: **Godemeyer, Thomas, Dr.**
Sternagel, Fleischer, Godemeyer & Partner
Patentanwälte
An den Gärten 7
51491 Overath (DE)

(56) Entgegenhaltungen:
WO-A-91/06564 WO-A-94/03201
DE-A- 3 347 548 FR-A- 2 550 204

- **CHEMICAL ABSTRACTS**, vol. 96, no. 21, 24.Mai 1982 Columbus, Ohio, US; abstract no. 174594, **NAKAMURA, RYUICHI ET AL** 'Action of fragments of human parathyroid hormone on blood pressure in rats' & **ENDOCRINOL. JPN.** (1981), 28(4), 547-9 CODEN: ECJPAE;ISSN: 0013-7219, 1981
- **CHEMICAL ABSTRACTS**, vol. 96, no. 5, 1.Februar 1982 Columbus, Ohio, US; abstract no. 29060, **NUSSBAUM, SAMUEL R. ET AL** 'Monoclonal antibodies directed against the biologically active region of parathyroid hormone' & **MONOCLONAL ANTIBODIES ENDOCR. RES.** (1981), 181-92. EDITOR(S): **FELLOWS, ROBERT E.;EISENBARTH, GEORGE S.** PUBLISHER: **RAVEN, NEW YORK, N. Y.** CODEN: 46PAAZ, 1981
- **JOURNAL OF IMMUNOASSAY**, Bd. 13, Nr. 1, 1992 NEW YORK, US, Seiten 1-13, **J. TAMPE ET AL.** 'Characterization of Antibodies against Human N-Terminal Parathyroid Hormone by Epitope Mapping' in der Anmeldung erwähnt
- **J. PHARMACOL. EXP. THER.** (1981), 216(3), 567-71 CODEN: JPETAB;ISSN: 0022-3565, 1981 **PANG, PETER K. T. ET AL** 'Hypotensive action of synthetic fragments of parathyroid hormone'

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist. (Art. 99(1) Europäisches Patentübereinkommen).

EP 0 783 522 B1

- CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 95, no. 17, 26. Oktober 1981 Columbus, Ohio, US; abstract no. 144316, HASHIMOTO, KEITARO ET AL 'Effects of parathyroid hormone and related polypeptides on the heart and coronary circulation of dogs' & J. CARDIOVASC. PHARMACOL. (1981), 3(4), 668-76 CODEN: JCPCDT; ISSN: 0160-2446, 1981
- E. Wingender et al. 'Structure- Function Relationship in Parathyroid Hormone' In: Advances in Protein Design, International Workshop 1988, GBF Monographs, Vol. 12, ed. by H. Blöcker, J. Collins, R.D. Schmid, D. Schomburg; pub. by VCH, 1988, p. 167-176

- ADVANCES IN EXPERIMENTAL MEDICINE AND BIOLOGY, Bd. 208, 1986 NEW YORK, US, Seiten 315-327, L.H. CAPORALE AND M. ROSENBLATT 'Parathyroid Hormone Antagonists effective in vivo'

Bemerkungen:

Die Akte enthält technische Angaben, die nach dem Eingang der Anmeldung eingereicht wurden und die nicht in dieser Patentschrift enthalten sind.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Peptide aus der Sequenz des hPTH (1-37), ein Diagnostikum erhältlich durch Immunisierung von Tieren mit den Peptiden, Antikörper oder deren Fragmente erhältlich durch Immunisierung von Tieren mit den Peptiden sowie die Verwendung der Peptide zur Herstellung eines Mittels zur Diagnose von biologisch aktivem h-PTH.

[0002] Die Sequenz des hPTH ist bereits bekannt aus Advances in Protein Design, International Workshop 1988, GBF Monographs, Vol. 12, Wingender et al., Seite 170, Fig. 1.

[0003] Einige Peptide aus der Sequenz des hPTH sind bereits im Stand der Technik beschrieben (WO-A- 94 03201, FR-A- 2 550 204, Journal of Immunoessay, Bd. 13, J. Tampe et al.; Journal of Pharmacology and Exp. Ther. (1981), 216 (3) Pang et al.; Chemical Abstracts, Vol. 96, No. 21, R. Nakamura et al.).

[0004] Humanes Parathormon (hPTH), ein lineares Polypeptid aus 84 Aminosäuren, spielt eine wichtige Rolle in der Regulation des Calciumstoffwechsels. Der Metabolismus dieses Hormons führt zu einer großen Zahl C-terminaler Fragmente, deren biologische Funktion noch nicht geklärt ist. Als zirkulierendes N-terminales Fragment ist das hPTH 1-37 festgelegt (EP-A 0 349 545). Dieses Fragment besitzt die volle biologische Aktivität des Gesamthormons. Diese nimmt allerdings bei Verlust der ersten Aminosäure, Serin, deutlich ab und geht ohne die ersten beiden Aminosäuren, Serin und Valin, völlig verloren.

[0005] Für das intakte Hormon hPTH 1-84 und für das N-terminale Fragment werden Serumkonzentrationen im Bereich von 10^{-12} mol/l gemessen. Zur Bestimmung solch niedriger Konzentrationen bedient man sich immunologischer Meßverfahren. Die validesten Ergebnisse liefern hierbei Meßverfahren nach dem Doppelantikörper oder Sandwich Prinzip (z.B. Two-site Radioimmunometric Assay, IRMA oder Sandwich Enzym Linked Immuno Sorbent Assay, Sandwich ELISA). Solche Assays sind für hPTH 1-84 kommerziell erhältlich. Zur Messung von hPTH 1-34 ist ein Assay nach dem Doppelantikörper-Prinzip nicht bekannt.

[0006] Hierfür sind zwei Antikörper notwendig. Diese müssen, um eine gegenseitige sterische Hinderung zu vermeiden, Epitope des Antigens erkennen, die in ausreichender Entfernung zueinander liegen. Bei Immunisierung mit dem intakten Antigen erhält man ein heterogenes Gemisch unterschiedlicher Antikörper, die für einen Sandwich-Assay erst aufwendig gereinigt werden müssen. Zwar war es bisher möglich aufgrund theoretischer Berechnungen nach B.A. Jameson & H. Wolf, The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants, CABIOS 4, p 181-186, 1988 am N-Terminus eine bevorzugte immunogen wirkende Sequenz im Bereich der Aminosäuren 7 - 14 festzustellen. Eine Immunisierung mit N-terminalen Fragmenten nach etablierten Methoden führt in erster Linie zu Antikörpern, die, wie für hPTH 1-34 beschrieben (J. Tampe, P. Brozio, H.E. Manneck, A. Mißbichler, E. Blind, K.B. Müller, H. Schmidt-Gayk und F.P. Armbruster; Characterisation of antibodies against human N-terminal parathyroid hormon by epitope mapping; J. Immunoassay 13 S. 1-13, 1992), in dem Bereich dieser Aminosäuren binden. Diese Antikörper können aber nicht zwischen biologisch aktiven und biologisch inaktiven PTH 1-84 oder Fragmenten davon, denen die ersten beiden Aminosäuren Serin und Valin fehlen, unterscheiden.

[0007] Das der Erfindung zugrunde liegende technische Problem besteht darin, Peptide anzugeben, mit deren Hilfe die oben genannten Nachteile der Diagnose von biologisch aktivem h-PTH beseitigt werden können.

[0008] Das angesprochene technische Problem wird überraschenderweise gelöst durch Verwendung der Peptide aus der Sequenz des humanen Parathyroidhormons (hPTH) mit der Sequenz

hPTH 1-10

$\text{NH}_2\text{-Ser}^1\text{-Val}^2\text{-Ser}^3\text{-Glu}^4\text{-Ile}^5\text{-Gln}^6\text{-Leu}^7\text{-Met}^8\text{-His}^9\text{-Asn}^{10}\text{-OH}$

SEQ ID NO 1

hPTH 1-9

$\text{NH}_2\text{-Ser}^1\text{-Val}^2\text{-Ser}^3\text{-Glu}^4\text{-Ile}^5\text{-Gln}^6\text{-Leu}^7\text{-Met}^8\text{-His}^9\text{-OH}$

SEQ ID No 2

hPTH 1-8

$\text{NH}_2\text{-Ser}^1\text{-Val}^2\text{-Ser}^3\text{-Glu}^4\text{-Ile}^5\text{-Gln}^6\text{-Leu}^7\text{-Met}^8\text{-OH}$

SEQ ID NO 3

hPTH 1-7

$\text{NH}_2\text{-Ser}^1\text{-Val}^2\text{-Ser}^3\text{-Glu}^4\text{-Ile}^5\text{-Gln}^6\text{-Leu}^7\text{-OH}$

SEQ ID NO 4

hPTH 1-6

$\text{NH}_2\text{-Ser}^1\text{-Val}^2\text{-Ser}^3\text{-Glu}^4\text{-Ile}^5\text{-Gln}^6\text{-OH}$

SEQ ID NO 5

hPTH 1-5

$\text{NH}_2\text{-Ser}^1\text{-Val}^2\text{-Ser}^3\text{-Glu}^4\text{-Ile}^5\text{-OH}$

SEQ ID NO 6

zur Herstellung von Antikörpern oder Antikörperfragmenten zur Diagnose von biologisch aktivem hPTH (1-37).

[0009] In einer bevorzugten Verwendung können die Peptide am N-terminalen Ende, in der Seitenkette und/oder am C-terminalen Ende modifiziert sein, und zwar in Form von Acetylierungs-, Amidierungs-, Phosphorylierungs- und/oder Glycosylierungsprodukten und/oder an Carrierproteine ausgewählt aus der Gruppe Hämocyanin, Thyroglobulin, Rinderserumalbumin, Ovalbumin oder Mausserumalbumin gebunden sein. Die Bindung an die Carrierproteine erfolgt vorzugsweise durch Carbodiimid oder Formaldehyd.

[0010] Das technische Problem wird weiterhin gelöst durch einen Antikörper oder ein Antikörperfragment, die ein Peptid spezifisch erkennen und binden, wobei das Peptid ausgewählt ist aus der Gruppe SEQ ID NO 1 bis 4 und 6.

[0011] Das technische Problem wird auch gelöst, durch ein Diagnostikum zum Nachweis von biologisch aktivem humanen Parathyroidhormon (hPTH (1 - 37)) umfassend einen Antikörper oder ein Antikörperfragment, die ein Peptid spezifisch erkennen und binden, wobei das Peptid ausgewählt ist aus der Gruppe SEQ ID NO 1 bis 4 und 6 sowie durch die Bereitstellung eines Diagnostikums gemäß Ansprüchen 6 und 7.

[0012] Zudem wird das technische Problem gelöst durch ein in vitro Verfahren zum Nachweis von biologisch aktivem Parathyroidhormon (hPTH (1 - 37)) unter Verwendung des Antikörpers gemäß Anspruch 3 oder 4, bzw. einem in vitro Verfahren, in dem zusätzlich zu den Antikörpern gemäß Ansprüchen 3 oder 4 ein zweiter Antikörper oder Antikörperfragment verwendet wird, der im Bereich der Aminosäurepositionen 9-15 oder 30-37 des humanen Parathormons bindet, wobei beide Antikörper Epitope des Antigens erkennen, die in ausreichender Entfernung zueinander liegen, um eine gegenseitige sterische Hinderung zu vermeiden.

[0013] Die genannten Sequenzen repräsentieren in ihrer Primärstruktur wesentliche Merkmale der Sekundärstruktur, wie sich durch NMR-Daten unterstützend belegen läßt. Voraussetzung dazu war eine Festlegung der Sekundärstruktur für PTH 1-37 in physiologischer Lösung.

[0014] Die genannten strukturell auffälligen Bereiche wirken gut immunogen. Es werden Antikörper gebildet, die an den ersten Aminosäuren des N-Terminus binden. Bereits das Fehlen von zwei Aminosäuren führt zu einem erheblichen Affinitätsverlust. Da diese Aminosäuren zur Ausübung der biologischen Wirkung unerlässlich sind, ist es mit den erfindungsgemäßen Peptiden möglich Antikörper zu erhalten, die nur hPTH und Fragmente davon erkennen, die biologisch aktiv sind.

[0015] Weiterhin sind Antikörper herstellbar, die den midregionalen Bereich 9-15 detektieren, und Antikörper, die C-terminal im Bereich der Aminosäuren 30-37 binden. Erfindungsgemäß können also Antikörper gegen Bereiche des hPTH 1-37 produziert werden, die aufgrund theoretischer Berechnungen im Gesamtmolekül nicht immunogen wirken. Diese Bereiche liegen zudem soweit auseinander, daß keine sterische Hinderung vorliegt, die ein gleichzeitiges Binden zweier Antikörper verhindern würde.

[0016] Die Peptide können verwendet werden, um ein Diagnostikum herzustellen. Das erfindungsgemäße Diagnostikum ist dabei erhältlich durch an sich bekannte Immunisierung von Tieren mit mindestens einem der Peptide. Nach der Immunisierung kann aus den immunisierten Tieren eine Immunglobulin-Fraktion isoliert werden, die Antikörper-Fractionen enthält, welche einen Antikörper-Titer gegen mindestens eines der Peptide aufweisen. Die so erhaltenen Antikörpern sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung. In einer alternativen Ausführungsform können neben den vollständigen Antikörpern bestehend aus F_{ab} und F_c auch deren Fragmente wie F_{ab} oder Fragmente der Antikörper verwendet werden, welche die Idiotypen zu den Epitopen der Peptide sind.

[0017] Die Peptide sind zur Herstellung eines Mittels zur Diagnose von biologisch aktiven h-PTH (1-37) geeignet.

[0018] Die Erfindung wird anhand der folgenden Beispiele näher beschrieben:

Beispiel 1

Festphasensynthese der Peptide:

5 [0019] Das Verfahren zur Synthese der Peptide beruht auf der Peptidsynthese am festen Träger. Die C-terminale Aminosäure wird jeweils in Gegenwart von Dicyclohexylcarbodiimid und Dimethylaminopyridin an das Trägermaterial gebunden. Als Trägermaterial für die Synthesen werden Wang-Harz oder entsprechende Harze eingesetzt.

[0020] Folgende L-Aminosäure-Derivate werden für die Synthese der Sequenz, ausgehend vom aufgeführten Peptidyl-Harz, verwendet: a) hPTH 1-10: Fmoc-Asn(Trt)-Wang-Harz, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Leu-OH, 10 Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Val-OH, Boc-Ser(tBu)-OH. b) hPTH 9-18: Fmoc-Met-Wang-Harz, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Boc-His(Trt)-OH. c) hPTH 24-37: Fmoc-Leu-Wang-Harz, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Leu-OH.

15 [0021] Die Synthese kann durch in situ-Aktivierung mit 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluoroborat (TBTU) oder dessen Derivaten oder mit Benzotriazol-1-yl-oxy-tris-(dimethylamino)-phosphoniumhexafluorophosphat (BOP) oder dessen Derivaten in Gegenwart von Diisopropylethylamin oder N-Methylmorpholin und 1-Hydroxybenzotriazol durchgeführt werden, wobei während der Kupplungen in N,N-Dimethylformamid, N,N-Dimethylacetamid oder N-Methylpyrrolidon ein vier- bis zehnfacher Überschuß der Fmoc-L-Aminosäure verwendet wird. Die Abspaltungen der Fmoc-Gruppen werden mit 20% Piperidin oder 2% Piperidin und 2% 1,8-Diazabicyclo[5,4,0]undec-7-en (DBU) in N,N-Dimethylformamid, N,N-Dimethylacetamid oder N-Methylpyrrolidon durchgeführt. Nach der Synthese werden die Harze mit 2-Propanol und Dichlormethan gewaschen und im Hochvakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

20 [0022] Zur Abspaltung vom Träger und Entblockierung wird das Peptidyl-Harz 30-90 Minuten bei Raumtemperatur mit Trifluoressigsäure, die 5% Scavenger, Wasser, Ethandiol, Phenol oder Thioanisol, enthält, umgesetzt, filtriert, mit Trifluoressigsäure gewaschen und anschließend mit tert-Butylmethylether ausgefällt. Der Niederschlag wird aus wäßriger Lösung lyophilisiert.

Beispiel 2

30

Reinigung und Analyse

[0023] Die Reinigung der Rohprodukte erfolgt chromatographisch über eine C18-Reverse-Phase-Säule (10µm, Puffer A: 0,01 N HCl in Wasser; Puffer B: 20% Isopropanol, 30 % Methanol, 50% Wasser, 0,01 N HCl; Gradient: 10-80% 35 in 60 Minuten; Detektion 230 nm).

[0024] Die Reinheit der Produkte wird durch Massenspektrometrie und C18-Reverse-Phase-Chromatographie bestimmt.

Beispiel 3

40

Kopplung an Carrierprotein

[0025] Als Carrierprotein werden Hämocyanin, Thyroglobulin, Rinderserumalbumin, Ovalbumin oder Mausserumalbumin verwendet. Die Kopplung erfolgt nach der Carbodiimid-Methode über Carboxylgruppen des Peptides. Das Peptid wird in wässriger Lösung durch 5 minütige Umsetzung mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid-Hydrochlorid aktiviert. Die Kopplung erfolgt durch Zugabe des aktivierten Peptides zu einer wässrigen Lösung des Carriers. Das molare Verhältnis beträgt 1 Peptid auf 50 Aminosäuren des Carrierproteins. Die Umsetzung dauert 4 Stunden. Die Reaktion wird durch Zugabe von Natriumacetat in einer Endkonzentration von 100 mM gestoppt. Man läßt eine Stunde inkubieren.

50 [0026] Die Abtrennung des Protein-Peptid Konjugates vom Peptid erfolgt durch wiederholte Dialyse gegen 100 mM Phosphatpuffer pH 7,2.

Beispiel 4

55 Synthese der Multiple Antigenic Peptides (MAP)

[0027] Die dreifache Lysin-Verzweigung wird erreicht, indem an C-terminales Alanin, gebunden an Wang-Harz, in drei Kupplungszyklen jeweils Fmoc-L-Lysin(Fmoc)-OH gebunden wird. Durch Abspaltung mit Piperidin werden danach

acht freie Aminofunktionen erhalten, an denen die Sequenzen des humanen Parathormons nach obiger Beschreibung synthetisiert werden.

Beispiel 5

5

Immunisierung

10

[0028] Für die Erstimmunisierung werden pro kg Körpergewicht des zu immunisierenden Tieres 125 µg des Carrier-Peptid Konjugates bzw. MAP in 250 ml Wasser gelöst und mit 250 µl kompletten Freund'schen Adjuvans emulgiert. Die Emulsion wird über den Rücken verteilt in 10 Portionen s.c. appliziert.

[0029] Das Boostern erfolgt nach 2-4 Wochen analog. Hierbei wird lediglich das komplette Freund'sche Adjuvans durch inkomplettes Freund'sches Adjuvans ersetzt.

15

Patentansprüche

1. Verwendung der Peptide aus der Sequenz des humanen Parathyroidhormons (hPTH) mit der Sequenz

20

hPTH 1-10

NH₂-Ser¹-Val²-Ser³-Glu⁴-Ile⁵-Gln⁶-Leu⁷-Met⁸-His⁹-Asn¹⁰-OH

SEQ ID NO 1

25

hPTH 1-9

NH₂-Ser¹-Val²-Ser³-Glu⁴-Ile⁵-Gln⁶-Leu⁷-Met⁸-His⁹-OH

SEQ ID No 2

30

hPTH 1-8

35

NH₂-Ser¹-Val²-Ser³-Glu⁴-Ile⁵-Gln⁶-Leu⁷-Met⁸-OH

SEQ ID NO 3

40

hPTH 1-7

NH₂-Ser¹-Val²-Ser³-Glu⁴-Ile⁵-Gln⁶-Leu⁷-OH

SEQ ID NO 4

45

hPTH 1-6

NH₂-Ser¹-Val²-Ser³-Glu⁴-Ile⁵-Gln⁶-OH

SEQ ID NO 5

50

hPTH 1-5

55

NH₂-Ser¹-Val²-Ser³-Glu⁴-Ile⁵-OH

SEQ ID NO 6

zur Herstellung von Antikörpern oder Antikörperfragmenten zur Diagnose von biologisch aktivem hPTH (1-37).

2. Verwendung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, daß** die Peptide, am N-terminalen Ende, in der Seitenkette und/oder am C-terminalen Ende modifiziert sind in Form von Acetylierungs-, Amidierungs-, Phosphorylierungs- und/oder Glycosylierungsprodukten, und/oder gebunden sind an Carrierproteine ausgewählt aus der Gruppe Hämocyanin, Thyroglobulin, Rinderserumalbumin, Ovalalbumin oder Mausserumalbumin.
3. Antikörper oder Antikörperfragment, die ein Peptid spezifisch erkennen und binden, wobei das Peptid ausgewählt ist aus der Gruppe SEQ ID NO 1 bis 4 und 6.
4. Antikörper nach Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet, daß** der Antikörper oder das Antikörperfragment Peptide erkennen, die am N-terminalen Ende, in der Seitenkette und/oder am C-terminalen Ende modifiziert sind in Form von Acetylierungs-, Amidierungs-, Phosphorylierungs- und/oder Glycosylierungsprodukten, und/oder gebunden sind an Carrierproteine ausgewählt aus der Gruppe Hämocyanin, Thyroglobulin, Rinderserumalbumin, Ovalalbumin oder Mausserumalbumin.
5. Diagnostikum zum Nachweis von biologisch aktivem humanen Parathyroidhormon (hPTH (1-37)) umfassend einen Antikörper oder ein Antikörperfragment, die ein Peptid spezifisch erkennen und binden, wobei das Peptid ausgewählt ist aus der Gruppe SEQ ID NO 1 bis 4 und 6.
6. Diagnostikum nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet, daß** zusätzlich ein zweiter Antikörper oder Antikörperfragment enthalten ist, der im Bereich der Aminosäurepositionen 9-15 oder 30-37 des humanen Parathyroidhormons bindet, wobei beide Antikörper Epitope des Antigens erkennen, die in ausreichender Entfernung zueinander liegen, um eine gegenseitige sterische Hinderung zu vermeiden.
7. Diagnostikum nach Anspruch 5 oder 6, **dadurch gekennzeichnet, daß** der Antikörper oder das Antikörperfragment Peptide erkennen, die am N-terminalen Ende, in der Seitenkette und/oder am C-terminalen Ende modifiziert sind in Form von Acetylierungs-, Amidierungs-, Phosphorylierungs- und/oder Glycosylierungsprodukten, und/oder gebunden sind an Carrierproteine ausgewählt aus der Gruppe Hämocyanin, Thyroglobulin, Rinderserumalbumin, Ovalalbumin oder Mausserumalbumin.
8. Verfahren zum Nachweis von biologisch aktivem humanen Parathyroidhormon (hPTH (1-37)) in vitro unter Verwendung des Antikörpers gemäß Anspruch 3 oder 4.
9. Verfahren nach Anspruch 8, **dadurch gekennzeichnet, daß** zusätzlich ein zweiter Antikörper oder Antikörperfragment verwendet wird, der im Bereich der Aminosäurepositionen 9-15 oder 30-37 des humanen Parathyroidhormons bindet, wobei beide Antikörper Epitope des Antigens erkennen, die in ausreichender Entfernung zueinander liegen, um eine gegenseitige sterische Hinderung zu vermeiden.
10. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, **dadurch gekennzeichnet, daß** der Antikörper oder das Antikörperfragment Peptide erkennen, die am N-terminalen Ende, in der Seitenkette und/oder am C-terminalen Ende modifiziert sind in Form von Acetylierungs-, Amidierungs-, Phosphorylierungs- und/oder Glycosylierungsprodukten, und/oder gebunden sind an Carrierproteine ausgewählt aus der Gruppe Hämocyanin, Thyroglobulin, Rinderserumalbumin, Ovalalbumin oder Mausserumalbumin.

45 Claims

1. Use of peptides from the sequence of human parathyroid hormone (hPTH), having the sequence

hPTH 1-10

NH₂-Ser¹-Val²-Ser³-Glu⁴-Ile⁵-Gln⁶-Leu⁷-Met⁸-His⁹-Asn¹⁰-OH SEQ ID NO 1

hPTH 1-9**NH₂-Ser¹-Val²-Ser³-Glu⁴-Ile⁵-Gln⁶-Leu⁷-Met⁸-His⁹-OH****SEQ ID NO 2****hPTH 1-8****NH₂-Ser¹-Val²-Ser³-Glu⁴-Ile⁵-Gln⁶-Leu⁷-Met⁸-OH****SEQ ID NO 3****hPTH 1-7****NH₂-Ser¹-Val²-Ser³-Glu⁴-Ile⁵-Gln⁶-Leu⁷-OH****SEQ ID NO 4****hPTH 1-6****NH₂-Ser¹-Val²-Ser³-Glu⁴-Ile⁵-Gln⁶-OH****SEQ ID NO 5****hPTH 1-5****NH₂-Ser¹-Val²-Ser³-Glu⁴-Ile⁵-OH****SEQ ID NO 6**

in the production of antibodies or antibody fragments for diagnosing biologically active hPTH (1-37).

2. The use according to claim 1, **characterized in that** the peptides have been modified at the N-terminal end, in the side chain and/or the C-terminal end thereof in the form of acetylation, amidation, phosphorylation and/or glycosylation products and/or bound to carrier proteins selected from the group of hemocyanin, thyroglobulin, bovine serum albumin, ovalbumin, or mouse serum albumin.
3. An antibody or antibody fragment specifically identifying and binding a peptide, said peptide being selected from the group of SEQ ID NO 1 through 4 and 6.
4. The antibody according to claim 3, **characterized in that** the antibody or antibody fragment will identify peptides modified at the N-terminal end, in the side chain and/or the C-terminal end thereof in the form of acetylation, amidation, phosphorylation and/or glycosylation products and/or bound to carrier proteins selected from the group of hemocyanin, thyroglobulin, bovine serum albumin, ovalbumin, or mouse serum albumin.
5. A diagnostic agent for detecting biologically active human parathyroid hormone (hPTH (1-37)), said agent comprising an antibody or antibody fragment specifically identifying and binding a peptide, said peptide being selected from the group of SEQ ID NO 1 through 4 and 6.
6. The diagnostic agent according to claim 5, **characterized in that** a second antibody or antibody fragment is included in addition, which binds in the region of amino acid positions 9-15 or 30-37 of human parathyroid hormone, both antibodies being capable of identifying epitopes of the antigen located at a sufficient distance from each other so as to avoid mutual steric hindrance.
7. The diagnostic agent according to claim 5 or 6, **characterized in that** the antibody or antibody fragment will identify peptides modified at the N-terminal end, in the side chain and/or the C-terminal end thereof in the form of acetylation, amidation, phosphorylation and/or glycosylation products and/or bound to carrier proteins selected from the

group of hemocyanin, thyroglobulin, bovine serum albumin, ovalbumin, or mouse serum albumin.

8. A method of detecting biologically active human parathyroid hormone (hPTH (1-37)) *in vitro*, using the antibody according to claim 3 or 4.
9. The method as claimed in claim 8, **characterized in that** a second antibody or antibody fragment is used in addition, which binds in the region of amino acid positions 9-15 or 30-37 of human parathyroid hormone, both antibodies being capable of identifying epitopes of the antigen located at a sufficient distance from each other so as to avoid mutual steric hindrance.
10. The method according to claim 8 or 9, **characterized in that** the antibody or antibody fragment will identify peptides modified at the N-terminal end, in the side chain and/or the C-terminal end thereof in the form of acetylation, amidation, phosphorylation and/or glycosylation products and/or bound to carrier proteins selected from the group of hemocyanin, thyroglobulin, bovine serum albumin, ovalbumin, or mouse serum albumin.

Revendications

1. Utilisation de peptides contenus dans la séquence de l'hormone parathyroïdienne (hPTH) humaine, qui ont pour séquence

hPTH 1-10

NH₂-Ser¹-Val²-Ser³-Glu⁴-Ile⁵-Gln⁶-Leu⁷-Met⁸-His⁹-Asn¹⁰-OH SEQ ID N° 1

hPTH 1-9

NH₂-Ser¹-Val²-Ser³-Glu⁴-Ile⁵-Gln⁶-Leu⁷-Met⁸-His⁹-OH SEQ ID N° 2

hPTH 1-8

NH₂-Ser¹-Val²-Ser³-Glu⁴-Ile⁵-Gln⁶-Leu⁷-Met⁸-OH SEQ ID N° 3

hPTH 1-7

NH₂-Ser¹-Val²-Ser³-Glu⁴-Ile⁵-Gln⁶-Leu⁷-OH SEQ ID N° 4

hPTH 1-6

NH₂-Ser¹-Val²-Ser³-Glu⁴-Ile⁵-Gln⁶-OH SEQ ID N° 5

hPTH 1-5

NH₂-Ser¹-Val²-Ser³-Glu⁴-Ile⁵-OH SEQ ID N° 6

pour la fabrication d'anticorps ou de fragments d'anticorps pour le diagnostic de l'hPTH (1-37) biologiquement active.

- 5 2. Utilisation d'après la revendication 1, **caractérisée en ce que** les peptides, à leur extrémité terminale N, sur leur chaîne latérale, et/ou à leur extrémité terminale C sont modifiés sous forme de produits d'acétylation, d'amidification, de phosphorylation et/ou de glycosylation et/ou sont liés à une protéine porteuse choisie dans le groupe comprenant l'hémocyanine, la thyroglobuline, la sérum albumine de boeuf, l'ovalbumine ou la sérum albumine de souris.
- 10 3. Un anticorps ou un fragment d'anticorps, qui reconnaissent et se lient spécifiquement avec un peptide, ledit peptide étant sélectionné dans le groupe des SEQ ID N° 1 à 4 et du SEQ ID N° 6.
- 15 4. Anticorps d'après la revendication 3, **caractérisé en ce que** l'anticorps ou le fragment d'anticorps reconnaissent les peptides qui sont modifiés à leur extrémité terminale N, dans leur chaîne latérale, et/ou à leur extrémité terminale C sous forme de produits d'acétylation, d'amidification, de phosphorylation et/ou de glycosylation et/ou qui sont liés à une protéine porteuse choisie dans le groupe comprenant l'hémocyanine, la thyroglobuline, la sérum albumine de boeuf, l'ovalbumine ou la sérum albumine de souris.
- 20 5. Diagnostic pour la détection de l'hormone parathyroïdienne humaine biologiquement active (hPTH (1-37)) comprenant un anticorps ou un fragment d'anticorps, qui reconnaissent spécifiquement un peptide et forment une liaison avec celui-ci, le peptide étant sélectionné dans le groupe comportant les N° de SEQ ID de 1 à 4 et le N°6.
- 25 6. Diagnostic d'après la revendication 5, **caractérisé en ce qu'il** comporte en plus un deuxième anticorps ou fragment d'anticorps, qui forme une liaison dans une région des acides aminés ayant les positions de 9 à 15, ou de 30 à 37 de l'hormone parathyroïdienne humaine, dans lequel les deux anticorps reconnaissent des épitopes de l'antigène qui sont disposés à un éloignement suffisant l'un de l'autre, pour éviter une gêne stérique mutuelle.
- 30 7. Diagnostic d'après la revendication 5 ou 6, **caractérisé en ce que** l'anticorps ou le fragment d'anticorps reconnaissent les peptides, qui sont modifiés à leur extrémité terminale N, à leur chaîne latérale et/ou à leur extrémité latérale C sous forme de produits d'acétylation, d'amidification, de phosphorylation et/ou de glycosylation, et/ou qui sont liés à une protéine porteuse choisie dans le groupe comprenant l'hémocyanine, la thyroglobuline, la sérum albumine de boeuf, l'ovalbumine, ou la sérum albumine de souris.
- 35 8. Procédé de détection de l'hormone parathyroïdienne humaine biologiquement active (hPTH (1-37)) *in vitro*, effectué en utilisant l'anticorps d'après la revendication 3 ou 4.
- 40 9. Procédé d'après la revendication 8, **caractérisé en ce qu'en plus**, on utilise un deuxième anticorps ou fragment d'anticorps, qui forme une liaison dans une région des acides aminés ayant les positions de 9 à 15, ou de 30 à 37 de l'hormone parathyroïdienne humaine, dans lequel les deux anticorps reconnaissent des épitopes de l'antigène qui sont disposés à un éloignement suffisant l'un de l'autre, pour éviter une gêne stérique mutuelle.
- 45 10. Procédé d'après la revendication 8 ou 9, **caractérisé en ce que** l'anticorps ou le fragment d'anticorps reconnaissent les peptides, qui sont modifiés à leur extrémité terminale N, à leur chaîne latérale et/ou à leur extrémité latérale C sous forme de produits d'acétylation, d'amidification, de phosphorylation et/ou de glycosylation, et/ou qui sont liés à une protéine porteuse choisie dans le groupe comprenant l'hémocyanine, la thyroglobuline, la sérum albumine de boeuf, l'ovalbumine, ou la sérum albumine de souris.

50

55

(19) European Patent Office

(11) EP 0 783 522 B1

(12) EUROPEAN PATENT

(45) Publication Date and Disclosure of
Reference to the Granting of the Patent:
12/5/2001 Patent Gazette 2001/49

(51) Int. Cl.⁷: C07L 14/635,
C07K 16/24,
G01N 33/78

(21) Application No.: 95934629.7

(86) International Application No.:
PCT/EP95/03757

(22) Application Date: 9/22/1995

(87) International Publication No.:
WO 96/10041
(4/4/1996 Gazette 1996/15)

(54) PEPTIDES FROM THE hPTH SEQUENCE (1-37)

(84) Member States Cited:
AT CH DE FR GB LI

(30) Priority: 9/28/1994 DE 4434551

(43) Date of Publication of the Application:
7/16/1997 Patent Gazette 1997/29

(73) Patent Holder: Pharis Biotech GmbH
30625 Hannover (Germany)

(72) Inventors:
• FORSSMANN, Wolf-Georg
D-30625 (Germany)
• ADERMANN, Knut
D-30177 Hannover (Germany)
• HOCK, Dieter
D-74924 Neckarsbischofsheim (Germany)
• MÄGERLEIN, Markus
D-63785 Obernburg (Germany)

(74) Agent: Godemeyer, Thomas, Dr. Sternagel,
Fleischer, Godemeyer & Partner
Patent Attorneys
An den Gärten 7
51491 Overath (Germany)

(56) Oppositions:
WO-A-91/06564 WO-A-94/03201
DE-A-3 347 548 FR-A-2 550 204

• CHEMICAL ABSTRACTS, Vol. 96, No. 21, May 24, 1982, Columbus, Ohio, US; Abstract No. 174594, NAKAMURA, RYUCHI ET AL, 'Action of Fragments of Human Parathyroid Hormone on Blood Pressure in Rats', & ENDOCRINOL. JPN. (1981) 28(4), 547-9 CODEN: ECJPAE; ISSN: 0013-7219, 1981

• CHEMICAL ABSTRACTS, Vol. 96, No. 5, February 1, 1982, Columbus, Ohio, US; abstract No. 29060, NUSSBAUM, SAMUEL R. ET AL, 'Monoclonal Antibodies Directed Against the Biologically-Active Region of Parathyroid Hormone', & MONOCLONAL ANTIBODIES ENDOCR. RES. (1981), 181-92. EDITOR(S): FELLOWS, ROBERT E.; EISENBARTH, GEORGE S. PUBLISHER: RAVEN, NEW YORK, N.Y. CODEN: 46PAAZ, 1981

• JOURNAL OF IMMUNOASSAY, Vol. 13, No. 1, 1992, NEW YORK, US, pp. 1-13, J. TAMPE ET AL. 'Characterization of Antibodies Against Human N-Terminal Parathyroid Hormone by Epitope Mapping', mentioned in the Application

• J. PHARMACOL. EXP. THER. (1981) 216(3), 567-71 CODEN: JPETAB; ISSN: 0022-3565, 1981, PANG, PETER K.T. ET AL 'Hypotensive Action of Synthetic Fragments of Parathyroid Hormone'

Note: Within nine months after disclosure of the reference to the granting of the European Patent, anyone can file objections with the European Patent Office against the European Patent issued. The objection must be filed in writing and must state the grounds therefore. It is considered filed only when the objection fee has been paid. (Article 99(1) of the European Patent Convention).

- CHEMICAL ABSTRACTS, Vol. 95, No. 17, October 26, 1981, Columbus, Ohio, US; abstract No. 144316, HASHIMOTO, KEITARO ET AL, 'Effects of Parathyroid Hormone and Related Polypeptides on the Heart and Coronary Circulation of Dogs', & J. CARDIOVASC. PHARMACOL. (1981), 3(4), 668-76 CODEN: JCPCDT; ISSN: 0160-2446, 1981
- E. Wingender et al. 'Structure-Function Relationship in Parathyroid Hormone', in: Advances in Protein Design, International Workshop 1988, GBF Monographs, Vol. 12, ed. by H. Blöcker, J. Collins, R.D. Schmid, D. Schornburg; pub. By VCH, 1988, pp. 167-176

- ADVANCES IN EXPERIMENTAL MEDICINE AND BIOLOGY, Vol. 208, 1986, NEW YORK, US, pp. 315-327, L.H. CAPORALE AND M. ROSENBLATT, 'Parathyroid Hormone Antagonists Effective *In Vivo*'

Remarks:

The files contain technical data that was submitted after receipt of the application and that are not contained in this Patent.

Description

[0001] This invention relates to peptides from the hPTH sequence (1-37), a diagnostic agent obtainable by vaccination of animals with the peptides, antibodies or fragments thereof, that can be obtained by vaccination of animals with the peptides, as well as the use of peptides for production of an agent for diagnosis of biologically active h-PTH.

[0002] The hPTH sequence is already known from Advances in Protein Design, International Workshop 1988, GBF Monographs, Vol. 12, Wingender et al., p. 170, Figure 1.

[0003] Some peptides from the hPTH sequence have already been described in the state of the art (WO-A-94 03201, FR-A-2 550 204, Journal of Immunoassay, Vol. 13, J. Tampe et al.; Journal of Pharmacology and Exp. Ther. (1981), 216 (3) Pang et al., Chemical Abstracts, Vol. 96, No. 21, R. Nakamura et al.).

[0004] Human parathyroid hormone (hPTH), a linear polypeptide of 84 amino acids, plays an important role in regulating the calcium metabolism. The metabolism of this hormone leads to a large number of C-terminal fragments whose biological function has not been clarified yet. Human PTH 1-37 has been detected as a circulating N-terminal fragment (EP-A 0 349 545). This fragment possesses the full biological activity of the complete hormone. This decreases substantially, however, upon loss of the first amino acid, serine, and is completely lost upon removal of the first two amino acids, serine and valine.

[0005] For the intact hormone, hPTH 1-84, and for the N-terminal fragment, serum concentrations have been measured in the area of 10^{-12} mol/L. Immunological measurement techniques are used to detect such low concentrations. The most valid results are provided by the double-antibody or sandwich principle (e.g., two-site immunoradiometric assay (IRMA), or Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Sandwich ELISA)). These assays for hPTH 1-84 are available commercially. There is no assay for hPTH 1034 using the double antibody principle.

[0006] Two antibodies are required for this. To avoid reciprocal steric hindrance, the method must recognize epitopes of the antigen located at a sufficient distance from each other. Vaccination with intact antigens results in a heterogeneous mixture of various antibodies that have to be purified before the sandwich assay. Of course, detecting a preferred immunoactive sequence in the region of amino acids 7-14 at the N terminus was possible previously based on theoretical calculations according to B.A. Jameson & H. Wolf, "The Antigenic Index: A Novel Algorithm for Predicting Antigenic Determinants", CABIOS 4, pp. 181-186, 1988. Vaccination with N-terminal fragments according to established methods leads, initially, to antibodies that bind in this amino acid region, as described for hPTH 1-34 (J. Tampe, P. Brozio, H.E. Manneck, A. Mißbichler, E. Blind, K.B. Müller, H. Schmidt-Gayk and F.P. Armbruster; "Characterization of Antibodies Against Human N-Terminal Parathyroid Hormone by Epitope Mapping"; J. Immunoassay 13, pp. 1-13, 1992). However, these antibodies cannot distinguish between biologically-active and biologically-inactive PTH 1-84 or fragments thereof missing the first two amino acids, serine and valine.

[0007] The problem to which the invention relates consists of specifying peptides that can help to eliminate the above disadvantages in diagnosing biologically-active h-PTH.

[0008] The technical problem discussed is solved surprisingly by the use of peptides from the human parathyroid hormone sequence (hPTH) with the sequence

hPTH 1-10

NH₂-Ser¹-Val²-Ser³-Glu⁴-Ile⁵-Gln⁶-Leu⁷-Met⁸-His⁹-Asn¹⁰-OH

SEQ ID NO 1

hPTH 1-9

NH₂-Ser¹-Val²-Ser³-Glu⁴-Ile⁵-Gln⁶-Leu⁷-Met⁸-His⁹-OH

SEQ ID No 2

hPTH 1-8

NH₂-Ser¹-Val²-Ser³-Glu⁴-Ile⁵-Gln⁶-Leu⁷-Met⁸-OH

SEQ ID NO 3

hPTH 1-7NH₂-Ser¹-Val²-Ser³-Glu⁴-Ile⁵-Gln⁶-Leu⁷-OH

SEQ ID NO 4

hPTH 1-6NH₂-Ser¹-Val²-Ser³-Glu⁴-Ile⁵-Gln⁶-OH

SEQ ID NO 5

hPTH 1-5NH₂-Ser¹-Val²-Ser³-Glu⁴-Ile⁵-OH

SEQ ID NO 6

for production of antibodies or antibody fragments for the diagnosis of biologically-active hPTH (1-37).

[0009] In the preferred embodiment, the peptides can be modified at the N terminal end, the side chains and/or at the C terminal end, by acetylation, amidation, phosphorylation and/or glycosylation products and/or to carrier proteins selected from the group of hemocyanin, thyroglobulin, bovine serum albumin, ovalbumin or mouse serum albumin. They are preferably bound with the carrier protein through carbodiimide or formaldehyde.

[0010] The technical problem is further solved by an antibody or antibody fragment that specifically recognizes and binds with a peptide, where the peptide is selected from the groups of SEQ ID NO 1 through 4 and 6.

[0011] The technical problem is also solved by a diagnostic agent for detecting biologically-active human parathyroid hormone (hPTH (1-37)) comprising an antibody or an antibody fragment that specifically recognizes and binds with a peptide, where the peptide is selected from the groups of SEQ ID NO 1 through 4 and 6 as well as through the preparation of a diagnostic agent according to Claims 6 and 7.

[0012] In addition, the technical problem is solved by a process *in vitro* to detect biologically-active parathyroid hormone (hPTH (1-137)) using the antibody according to Claim 3 or 4, or a process *in vitro* in which, in addition to the antibodies according to Claim 3 or 4, a second antibody or antibody fragment is used that binds in the regions of amino acid positions 9-15 or 30-37 of human parathyroid hormone, where both antibodies recognize epitopes of the antigen that are located at a sufficient distance from each other to avoid reciprocal steric hindrance.

[0013] The primary structures of the above-cited sequences represent essential characteristics of the secondary structure, as supported by the NMR data. A precondition for this was determining the secondary structure of PTH 1-37 in saline solution.

[0014] The above-cited structurally-remarkable regions have good immunogenic activity. Antibodies are formed that bind to the first amino acids of the N terminus. The lack of two amino acids already leads to a substantial loss of affinity. Since these amino acids are essential to biological activity, it is possible to obtain antibodies with the peptides according to the invention that recognize only hPTH and fragments thereof that are biologically active.

[0015] Furthermore, antibodies can be produced that detect the mid-region areas 9-15, and antibodies that bind in the region of amino acids 30-37. According to the invention, therefore, antibodies can be produced against regions of hPTH 1-37 that do not have immunogenic effects based on theoretical calculations in the intact molecule. These regions are also located at such a distance from each other that there is no steric hindrance that would hinder the simultaneous binding of two antibodies.

[0016] The peptides according to the invention can be used to produce a diagnostic agent. The diagnostic agent according to the invention can be obtained by known vaccination of animals with at least one of the peptides. After vaccination, an immunoglobulin fraction can be isolated from the vaccinated animals; the fraction contains antibody fractions that have an antibody titer against at least one of the peptides. The antibodies thus obtained are also the subject of this invention. In an alternative embodiment, in addition to the complete antibodies consisting of F_{ab} and F_c , fragments thereof, such as F_{ab} , or fragments of antibodies are used; they are the idiotypes for the epitopes of the peptides.

[0017] The peptides are suitable for production of an agent for diagnosing biologically-active h-PTH (1-37).

[0018] The invention is described in greater detail based on the following examples:
Example 1

Solid Phase Peptide Synthesis

[0019] The process for synthesis of peptides according to the invention is based on peptide synthesis on solid carriers. The C terminal amino acids are bound to the carrier material in the presence of dicyclohexylcarbodiimide and dimethylaminopyridine. The carrier material used for the synthesis is Wang resin or similar resins.

[0020] The following L-amino acid derivatives are used for the synthesis of the sequence, starting with the specified peptidyl resin: a) hPTH 1-10: Fmoc-Asn(Trt)-Wang resin, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Val-OH, Boc-Ser(tBu)-OH. b) hPTH 9-18: Fmoc-Met-Wang resin, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Boc-His(Trt)-OH. c) hPTH 24-37: Fmoc-Leu-Wang resin, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Leu-OH.

[0021] The synthesis can be carried out through in-situ activation with 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborate (TBTU) or derivatives thereof, or with benzotriazol-1-yloxytris(dimethylamino) phosphonium hexafluorophosphate (BOP) or derivatives thereof in the presence of diisopropyl ethylamine or N-methylmorpholine and 1-hydroxybenzotriazole, where a four- to ten-fold excess of Fmoc-L-amino acid is used during the couplings in N,N-dimethylformamide, N,N-dimethylacetamide or N-methylpyrrolidone. The Fmoc groups are dissociated with 20% piperidine or 2% piperidine and 2% 1,8-diazabicyclo [5.4.0]undec-7-ene (DBU) in N,N-dimethylformamide, N,N-dimethylacetamide or N-methylpyrrolidone. After synthesis, the resin is washed with 2-propanol and dichloromethane and dried to a constant weight under a high vacuum.

[0022] For dissociation from the carrier and unblocking, the peptidyl resin is treated for 30 – 90 minutes at ambient temperature with trifluoroacetic acid containing 5% scavenger, water, ethanediol, phenol or thioanisole, then filtered, washed with trifluoroacetic acid and finally precipitated with tert-butyl methyl ether. The precipitate is lyophilized out of an aqueous solution.

Example 2

Purification and Analysis

[0023] The raw product is purified by chromatography in a C-18 reverse phase column (10 μ m, Buffer A: 0.01 N HCl in water; Buffer B: 20% isopropanol, 30% methanol, 50% water, 0.01 N HCl; gradient: 10 – 80% in 60 minutes; detection 230 nm).

[0024] The purity of the product is determined by mass spectrometry and C18 reverse phase chromatography.

Example 3**Coupling to Carrier Protein**

[0025] Hemocyanin, thyroglobulin, bovine serum albumin, ovalbumin or mouse serum albumin is used as a carrier protein. The coupling takes place according to the carbodiimide method, via the carboxyl groups of the peptide. The peptide is activated by a 5-minute treatment in an aqueous solution with 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride. Coupling occurs by the addition of the activated peptide to an aqueous solution of the carrier. The molar ratio is 1 peptide to 50 amino acids of the carrier protein. The treatment takes 4 hours. The reaction is stopped by addition of sodium acetate in a final concentration of 100 mM. Incubate for 1 hour.

[0026] The protein-peptide conjugate is separated from the peptide by repeated dialysis over 100 mM of phosphate buffer, pH 7.2

Example 4

Synthesis of Multiple Antigenic Peptides (MAP)

[0027] The triple lysine branch is achieved by binding Fmoc-L-lysine(Fmoc)-OH to C terminal alanine, bound to Wang resin, in three coupling cycles. Eight free amino functions are obtained by dissociation with piperidine; the sequences of human parathyroid hormone are synthesized at those functions according to the description above.

Example 5

Vaccination

[0028] 125 µg of the carrier-peptide conjugate or MAP, dissolved in 250 ml water and emulsified with 250 µl of complete Freund's adjuvant, is used per kg of body weight for the first vaccination. The emulsion is applied to the back in 10 separate SC injections.

[0029] Boosters are given similarly after 2-4 weeks. However, the complete Freund's adjuvant is replaced with incomplete Freund's adjuvant here.

Patent Claims

We claim:

1. Use of the peptides from the human parathyroid hormone (hPTH) sequence with the sequence:

hPTH 1-10

NH₂-Ser¹-Val²-Ser³-Glu⁴-Ile⁵-Gln⁶-Leu⁷-Met⁸-His⁹-Asn¹⁰-OH **SEQ ID NO 1**

hPTH 1-9

NH₂-Ser¹-Val²-Ser³-Glu⁴-Ile⁵-Gln⁶-Leu⁷-Met⁸-His⁹-OH **SEQ ID No 2**

hPTH 1-8

NH₂-Ser¹-Val²-Ser³-Glu⁴-Ile⁵-Gln⁶-Leu⁷-Met⁸-OH **SEQ ID NO 3**

hPTH 1-7

$\text{NH}_2\text{-Ser}^1\text{-Val}^2\text{-Ser}^3\text{-Glu}^4\text{-Ile}^5\text{-Gln}^6\text{-Leu}^7\text{-OH}$

SEQ ID NO 4

hPTH 1-6

$\text{NH}_2\text{-Ser}^1\text{-Val}^2\text{-Ser}^3\text{-Glu}^4\text{-Ile}^5\text{-Gln}^6\text{-OH}$

SEQ ID NO 5

hPTH 1-5

$\text{NH}_2\text{-Ser}^1\text{-Val}^2\text{-Ser}^3\text{-Glu}^4\text{-Ile}^5\text{-OH}$

SEQ ID NO 6

for production of antibodies or antibody fragments for diagnosis of biologically-active hPTH (1-37).

2. Use according to Claim 1, **wherein** the peptides, modified at the N-terminal end, the side chains and/or the C-terminal end with acetylation, amidation, phosphorylation and/or glycosylation products, and/or bound to carrier proteins selected from the group of hemocyanin, thyroglobulin, bovine serum albumin, ovalbumin or mouse serum albumin.
3. Antibodies or antibody fragments that specifically recognize and bind a peptide, where the peptide is selected from the group of SEQ ID NO. 1 through 4 and 6.
4. Antibodies according to Claim 3, **wherein** the antibodies or antibody fragments recognize peptides modified at the N-terminal end, the side chains and/or the C-terminal end with acetylation, amidation, phosphorylation and/or glycosylation products, and/or bound to carrier proteins selected from the group of hemocyanin, thyroglobulin, bovine serum albumin, ovalbumin or mouse serum albumin.
5. Diagnostic agent for detection of biologically-active human parathyroid hormone (hPTH (1-37)), comprising an antibody or antibody fragment that specifically recognizes and binds a peptide, where the peptide is selected from the group of SEQ ID NO. 1 through 4 and 6.
6. Diagnostic agent according to Claim 5, **wherein** in addition, a second antibody or antibody fragment is contained that binds in the regions of amino acid positions 9-15 or 30-37 of human parathyroid hormone, where both antibodies recognize epitopes of the antigen that are located at a sufficient distance from each other to avoid reciprocal steric hindrance.
7. Diagnostic agent according to Claim 5, **wherein** the antibodies or antibody fragments recognize peptides modified at the N-terminal end, the side chains and/or the C-terminal end with acetylation, amidation, phosphorylation and/or glycosylation products, and/or bound to carrier proteins selected from the group of hemocyanin, thyroglobulin, bovine serum albumin, ovalbumin or mouse serum albumin.
8. Process for detection of biologically-active human parathyroid hormone (hPTH (1-37)) *in vitro* using the antibody according to Claim 3 or 4.
9. Process according to Claim 8, **wherein** in addition, a second antibody or antibody fragment is contained that binds in the regions of amino acid positions 9-15 or 30-37 of human parathyroid hormone, where both antibodies recognize epitopes of the antigen that are located at a sufficient distance from each other to avoid reciprocal steric hindrance.
10. Process according to Claim 8 or 9, **wherein** the antibodies or antibody fragments recognize peptides modified at the N-terminal end, the side chains and/or the C-terminal end with acetylation, amidation, phosphorylation and/or glycosylation products, and/or bound to carrier proteins selected from the group of hemocyanin, thyroglobulin, bovine serum albumin, ovalbumin or mouse serum albumin.

[English claims]

[French claims identical to English and German claims]

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKewed/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.